

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-308186

(43)Date of publication of application : 28.11.1995

(51)Int.Cl.

C12M 3/04

H01L 51/00

// G01N 27/327

(21)Application number : 06-287588

(71)Applicant : KANEKAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 26.10.1994

(72)Inventor : MATSUDA TAKEHISA

INOUE KAZUHIKO

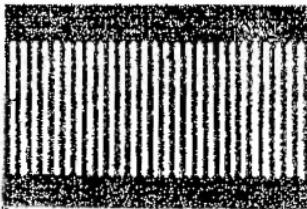
TANI NOBUTAKA

### (54) TOOL FOR CONTROLLING CELL SEQUENCE AND METHOD FOR CONTROLLING CELL SEQUENCE

#### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a tool capable of readily controlling a cell sequence in high-accuracy by culturing a cell by the same manner as that of a conventional cell culture and easily forming a cell sequence pattern having extreme fineness and a high resolution.

**CONSTITUTION:** A cell adhesion surface comprising a cell adhesion polymer is immobilized to a cell nonadhesion surface in a patterned state or a cell nonadhesion surface comprising a cell nonadhesion is immobilized to a cell adhesion surface in a patterned state to provide a tool for controlling a cell sequence, having a sequence pattern composed of the cell adhesion surface and the cell nonadhesion surface. A method for controlling a cell sequence, capable of culturing a cell by using the tool for controlling a cell sequence is provided.



(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-308186

(43)公開日 平成7年(1995)11月28日

(51)InCL1\*  
 C12M 3/04  
 H01L 51/00  
 # G01N 27/327

識別記号 序内整理番号  
 Z

F 1

技術表示箇所

H01L 29/28  
 G01N 27/30 351  
 審査請求 有 請求項の数3 FD (全6頁)

(21)出願番号 特願平6-287588  
 (22)分割の表示 特願平1-141984の分割  
 (22)出願日 平成1年(1990)6月3日

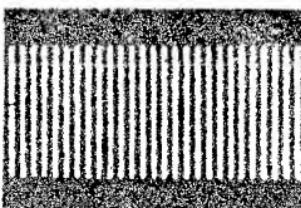
(71)出願人 00000004  
 雷酒化学工業株式会社  
 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
 (72)発明者 横田 武久  
 大阪府箕面市粟生外院244-1、B-512  
 (72)発明者 井上 和彦  
 兵庫県神戸市須磨区横尾8丁目1-1、42  
 -504  
 (72)発明者 谷 銀平  
 大阪市阿倍野区又の里4丁目17-29  
 (74)代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (411名)

(54)【発明の名前】 細胞の配列制御用具および細胞の配列制御法

## (57)【要約】

【目的】 従来の細胞培養と同様にして培養を行なって容易に精度の高い細胞配列制御をすることができ、極めて繊細かつ高精度度の細胞配列パターンを容易に形成することができる細胞の配列制御用具をうる。

【構成】 細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりも細胞接着性表面がパターン状に固定化されてなる、または細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりも細胞非接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりも配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具、および前記細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法。



(2)

特許平7-308186

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりも細胞接着性表面がバターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具。

【請求項2】 細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりも細胞接着性表面がバターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具。

【請求項3】 請求項1または請求項2記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞の配列制御用具および細胞の配列制御法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞工学、LSI技術、医工学などの急速な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工器器、さらにはニューロコンピューターなどと注目を集め、これらの開発が活発に行なわれている。

【0003】 細胞を藍むように配列させ、しかもその機能を維持させておくことは難しく、細胞を用いたデバイス実現の一つの障壁となっている。細胞を藍むように配列させて回路構造を形成させることは、細胞の配列制御技術は、これらのデバイス実現のための大きなキーテクノロジーとなりうる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 細胞の配列を制御する試みとしては、インクジェットプリンタを用いて細胞接着性蛋白質であるフィロネクチンを塗布してバターンを形成し、この上で細胞を培養させた例があるが、解像度がわざとなく不均一であり、微細加工には適していない。

【0005】 また、最近、人工的な凹凸面を用いて神経細胞シナプス成長の方向制御を試みた例があるが、藍むような配列を形成させるまでには至っていない。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、このような実際に鑑み、細胞の配列を容易に制御する方法について脱意研究を重ねた結果、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有する材料表面上で細胞を藍むことにより、細胞の配列が容易に制御できること、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有する細胞の配列制御用具が、特定の工程を経て容易に製造できることを見出しつつ、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明は細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりも細胞接着性表面がバターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具(請求項1)、細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりも細胞接着性表面がバターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりもなる配列バターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具(請求項2)および請求項1または請求項2記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法(請求項3)に関する。

【0008】

【実施例】 本発明の細胞の配列制御用具は、バターン化した細胞接着性表面と細胞非接着性表面とが本発明の細胞の配列制御用具となる材料の表面に形成されたものである。

【0009】 前記細胞接着性表面とは、カルボキシル基やアミノ基などの電荷を有する官能基および(または)RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)のような細胞接着性ペプチドを導入した表面、または細胞接着性を有する高分子を固定した表面をいう。

【0010】 前記カルボキシル基やアミノ基などの官能基は、本発明の配列制御用具となる材料表面をブラズマなどの放電処理することにより導入することができる。この際の前記材料としてはプラスチック製の培養用皿、フィルム、チューブなどを利用しうる。

【0011】 前記細胞接着性を有する高分子の具体例としては、たとえばポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミンなどの電荷を有する合成高分子、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、デキストラノ硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの電荷を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ハイドロキチコンなどの細胞接着性蛋白質、さらには細胞接着性蛋白質や細胞接着性ペプチドを固定した合成高分子などがあげられるが、これらに限られるものではない。これらは並用で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0012】 また、前記細胞非接着性表面とは、接触角が10度以上の親水性表面、または電荷を有する接触角が5度以下の親水性表面をいう。

【0013】 前記親水性表面の具体例としては、たとえばポリテトラオキエチレン、シリコンなどから形成された表面があげられるが、これらに限られるものではない。

【0014】 また、前記接触角が5度以下の親水性表面の具体例としては、薬局持たない親水性高分子よりもなる表面、たとえばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、さら

(3)

特許平7-308186

4

3

にはこれらを構成する単量体の共重合体、セルロースなどがあげられるが、これらに既定されるものではない。【0015】さらに、本発明の細胞の配列制御用具を形成しうる素材としては、たとえば各種プラスチック、ガラス、金属などがあげられ、すでにデバイスとして用いられているたとえば焼成用皿、半導体基盤などの材料も利用できる。

【0016】つぎに前記細胞の配列制御用具の製作について説明する。

【0017】まず第1の製法として、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを

- (1) 光感性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは接着させて存在させる工程、
- (2)(1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および
- (3) 洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる膜を細胞接着性表面に形成させる工程を経て形成する方法を説明する。

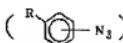
【0018】第1の製法においては、たとえば細胞接着性親水性高分子、好みしくは前記電荷を持たない親水性高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物とからなる組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞接着性表面に存在させたのち、光現像することにより、細胞接着性表面に容易に固定される。また、前

記高分子に直鎖アジド基を導入したもの用いることもできるが、アジド基を導入する特別な操作が不要な点および現像時の未反応物の除去が容易な点で、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりも組成物を用いるのが好ましい。

【0019】前記2個以上のアジド基を有する化合物としては、たとえば第1表に示すような一般的なビスアジド化合物、1分子中に2個以上のアジド基を導入したアジド化ポリマーなどが利用できるが、これらに既定されるものではない。上記アジド基には、たとえばカルボニルアジド ( $R-C(=O)-N_3$ )、スルホニルアジド ( $R-SO_2-N_3$ )、芳香族アジド

【0020】

【化1】



などがあるが、安定性のよい芳香族アジドまたはスルホニルアジドが好ましい。また、より長波長域の光でナイトレーンに転化できる点で、ニトロ基のような電子吸引性置換基を有する芳香族アジド、1様または2様感光性のビスアジド化合物がさらに好ましい。

【0021】

【表1】

(4)

特開平7-308186

5

6

表 1

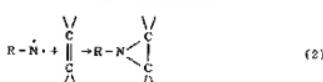
ビスアツド化合物	吸光波長
<chem>N#Cc1ccc(C)c(C)c1N#</chem>	deep UV
<chem>N#Cc1ccc(C)c(Cl)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(C)c(C)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(O)c(C)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(S(=O)(=O)c2ccc(N#)cc2)cc1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(S(=O)(=O)c2ccc(N#)cc2)cc1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(SS)c(C)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(S)c(C)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(C)c(C)c1N#</chem>	1. 鮎
<chem>N#Cc1ccc(C)c(C)c1N#</chem>	〃
<chem>N#Cc1ccc(C)c(C)c1N#</chem>	ε = 40

該高分子は、アジト基が光照射により転化したナイトレン基が、細胞接着性表面および該高分子に対して、たとえば次式に示すような化学反応、すなわち、水素引き抜き反応(1)、二重結合への付加やC=C結合への挿入(2) \*

\* およびカップリング反応(3)を行なうことにより固定される。

【0022】

【(1)】



なお、ナイトレン基はさわめて反応性が高いため、上記の反応以外の反応による結合が生じるばかりもある。また、上記反応が該高分子間に生じ、架橋が生じるばかりがあるが、これにより該高分子がより安定的に細胞接着性表面に固定されるばかりがある。さらに、該高分子が

前述のごとく細胞接着性表面に結合していなくても、皮膜として付着し固定されていてもよい。

【0023】該高分子と2個以上のアジト基を有する化合物よりなる組成物を細胞接着性表面に存在させる方法としては、該組成物をメタノールのような揮発性有機溶

端に溶媒または樹脂を、この波を細胞接着性表面に、塗布または噴霧したのち乾燥し、該組成物の薄層を細胞接着性表面に形成させる方法。該組成物の水溶液またはコロイド溶液と細胞接着性表面と接触させ、細胞接着性表面に吸着させる方法などがある。これらのなかでも均質な薄層がえられる点で、揮発性有機溶媒の溶液を用いてキャスト製膜する方法が好ましい。

【0024】また、2個以上のアジド基を有する化合物を細胞接着性表面に存在させたのち、その上に感光分子を存続させてもよい。

【0025】前記光照射用に用いる光源としては、高圧水銀灯、低圧水銀灯、超高圧水銀灯などの各高水銀灯、エキシマレーザーなどがあるが、長波長域で感光性のアジド化合物を用いるばあいは、フィルターにより短波長域をカットすることにより、短波長紫外線による感光分子や材料表面への影響を軽減することができる。これは蛋白質などの親水性高分子を用いるばあいとくに好ましい。

【0026】また、ナイトレン基の反応は極めて短時間で完了するため、露光時間は5分以内でよい。

【0027】パターン露光の方法は、パターンを有するフォトマスクを設置した上より光照射する方法、エキシマレーザーによるリソグラフィーを利用する方法などがある。

【0028】一方、細胞の配列制御用具の第2の製法は、前記第1の製法の(1)の工程において、感光性を有する細胞接着性高分子を細胞接着性表面に塗布もししくは吸着させるかわりに、感光性を有する前記細胞接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もししくは吸着させるほかは、第1の製法と同様にして製造する方法である。

【0029】第2の製法によれば、たとえば前記細胞接着性を有する高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物による組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞接着性表面に存続させたのち、光照射することにより、細胞接着性表面に容易に固定される。

【0030】前記のごとく製造される細胞の配列制御用具を用い、常法により細胞を培養することにより、細胞配列を容易に創設でき、μmオーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。

【0031】えられた微細パターンは、超小型バイオセンサー、スマッシング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピューターなどの開発に有用である。

【0032】つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0033】実施例1

N、N-ジメチルアクリラミドモノマー（（株）興人

製）をアセトン中、過酸化ベンゾイルおよびN、N-ジメチル-p-トリアジンレドックス系開始剤として重合し、ボリ（N、N-ジメチルアクリラミド）（以下、PDMA）という）をえた。

【0034】えられたPDMA 95部（重畳部、以下同様）に対して、ビスマジド化合物である4、4'-ジアジドステルベン-2、2'-ジスルホン酸ソーダ5部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1%（重畳%、以下同様）溶液とした。

【0035】この溶液を、組織培養用ポリスチレンシャーレ（コーンリング（CORNING）社製）上に滴下し、キャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、この上に図3に示すような開孔部と非開孔部とからなる一对の幅が250μmであるスリットを有するフォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。なお、図3はフォトマスクの写真のスケッチ図である。

【0036】つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PDMA およびシャーレ表面よりなる隙縫パターンを形成したシャーレをえた。

【0037】このようにしてえたシャーレに、牛血管内皮細胞を播種し、1%牛血清（FCS）を含むDME（McCoy's Modified Eagle's Medium）を培地として用い、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養したところ、内皮細胞はPDMA非開孔部（非露光部）のみを選択的に伸展・増殖し、図1および図2に示す細胞の配列パターンがえられた。図1は赤色された細胞の配列パターンの写真（倍率は図3のものとなる写真と同じ）のスケッチ図、図2は図1のものとなる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図である。

【0038】実施例2

実施例1のにおいて同様にして調製したビスマジド化合物を含むPDMA の0.1%メタノール溶液を、オリスチレンシャーレ上に滴下し、キャスト製膜して風乾したのち、高圧水銀灯を用いて紫外線を照射し、PDMA 光固定したシャーレ（以下、PDMA シャーレという）をえた。

【0039】N、N-ジメチルアクリラミド80部とアクリロキシシハク酸ミド（国産化学製）20部よりなる共重合体と、フィブロネクチンとを、リン酸緩衝液（pH8.5）中で反応させ、フィブロネクチンを固定したN、N-ジメチルアクリラミド共重合体（以下、FN-PDMAといいう）をえた。

【0040】FN-PDMA 95部に対してビスマジド化合物5部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1%溶液とした。

【0041】えられた溶液をPDMA シャーレ上にキャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、フォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。

(6)

特開平7-308186

10

【0042】つぎにメタノール、水で充分洗浄して埋蔵し、FM-PDMAおよびFDMA シャーレ表面よりなる詳細パターンを形成したシャーレをえた。

【0043】このようにしてえたシャーレを用いて実験例1のばいと同様にして、牛血管内皮細胞を培養したところ、内皮細胞は、FM-PDMA固定部（発光部）のみに選択的に伸展・増殖し、細胞による配列パターンがえられた。

【0044】

【発明の動機】本発明の細胞の配列制御用具は、細胞の付着の有無の選択性がよく、これ用いることにより、従来の細胞培養と同様にして培養を行なって容易に精度の高い細胞配列制御をすることができる、極めて詳細かつ高解像度の細胞配列パターンを容易に形成することができる。

\* する。

【0045】本発明は、各種細胞機能を応用した超小型バイオセンサー、スイッチング素子、ハイブリッド型人工臍器、バイオリアクター、ニューロコンピューターなどの開発に大きく貢献するものである。また、細胞間の情報伝達などの細胞機能の研究においても応用できるものである。

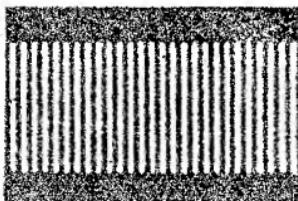
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は染色された細胞の配列パターンの写真のスケッチ図である。

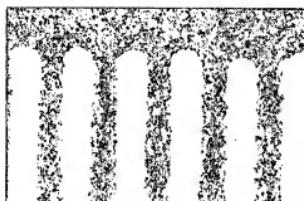
【図2】図2は図1のものとなる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図である。

【図3】図3はフォトマスクの写真（倍率は図1のもとなる写真と同じ）のスケッチ図である。

【図1】



【図2】



【図3】

